



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115354024 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 18

(21) 申请号 202210914640.8

(22) 申请日 2022.07.29

(71) 申请人 杭州昱鼎生物科技有限公司

地址 311200 浙江省杭州市萧山区经济技术
开发区桥南区块春江路1号3号楼

(72) 发明人 梁颖 蒋青霞 张博文

(74) 专利代理机构 杭州融方专利代理事务所

(普通合伙) 33266

专利代理师 沈相权 詹雨露

(51) Int. Cl.

C12N 5/078 (2010.01)

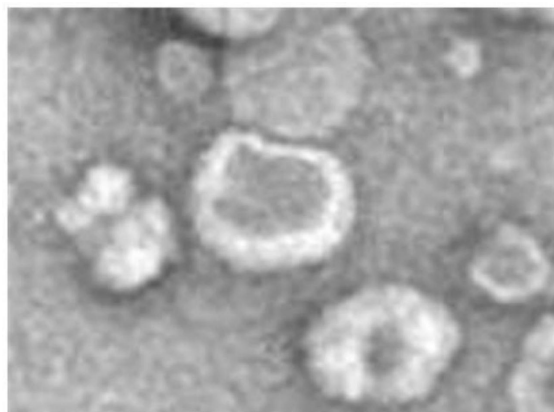
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用

(57) 摘要

本发明是一种提取试剂盒,特别涉及一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用。该方法通过三步差速离心,除去细胞、血小板和非外泌体微泡。又通过针孔式过滤器去除220nm以上杂质,再通过蛋白酶处理溶解杂质蛋白(白蛋白和载脂蛋白等)或使蛋白聚合物分解成小的肽段,然后通过超滤法去除10nm以下的杂质。留下的样本分子尺寸处于外泌体的分子尺寸范围,最后通过SEC柱在外泌体区域得到纯化外泌体,最后根据浓度要求,再进一步超滤,纯化并浓缩得到高质量外泌体。该组合方法简单易行,效果显著,成功解决了血液样品成分复杂,杂蛋白多,外泌体分离提取难度大,电镜下难于找到清晰的外泌体囊泡状结构等问题。



1. 一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用,其特征在于按以下步骤进行:

(1)、收集管收集到人血液:温度为4℃,重量为200~500g,离心时间为5-10min,离心结束后转移上清到新的离心管;

(2)、转移后的上清:温度为4℃,重量为2000~2500g,离心时间为10~15min,离心结束后陆续转移上清到新的离心管;

(3)、等步骤(2)结束后,转移上清到新的离心管,作为人血浆样品;

(4)、用PBS将步骤(3)制得的血浆进行稀释,稀释血浆至2倍体积,再进行离心操作:温度为4℃,重量为10000-18000g,离心时间为30min,离心结束后转移上清到新的离心管;

(5)、步骤(4)后,将新的离心管的血液依次通过0.8um滤膜和0.22um滤膜进行过滤处理;

(6)、对步骤(5)中过滤后的血液进行蛋白酶消化处理,蛋白酶为胃蛋白酶、胰蛋白酶或其它具有蛋白消化功能的酶中的一种或多种;

配制蛋白酶溶液50-1000ug/ml,血液样本加入蛋白酶溶液50-1000u1/ml,旋涡30秒混匀;蛋白酶用PBS或双蒸水稀释。

(7)、步骤(6)后,将混匀后的溶液加入到温度为37℃的水浴锅中孵育5~60分钟;

(8)、步骤(7)后,转移到60℃水浴锅中孵育3~15分钟;

(9)、步骤(8)后,转移样品到预处理过的100KD超滤管中,温度为4℃,重量为3000-4500g,离心时间为5-15min;弃滤过液,超滤管内液体转移到新的离心管中,用移液枪取适量PBS轻轻吹洗超滤管的滤膜数次,并转移溶液到方才的离心管中,离心管中样品量终体积为0.5-3ml;

(10)柱平衡:3倍柱体积的PBS溶液润洗SEC柱;润洗完成,待底盖出口无液体流出后,加入步骤(9)离心管中样品,待底盖出口样品流尽,无液体流出,再加洗脱液PBS溶液,空柱体积为前1.5ml不收集,收集所需外泌体的体积为空柱体积之后的1~4ml洗脱液;

(11)、转移收集的洗脱液到100KD超滤管,温度为4℃,重量为3000-4500g,离心时间为5-15min;弃滤过液,根据外泌体浓度需求,加0.2~1ml的PBS溶液于100KDa超滤管的滤膜上,静置1~3min;用移液枪吸取滤膜上的PBS溶液,轻轻吹洗超滤膜数次,收取所需浓度的外泌体,于-80摄氏度保存。

2. 根据权利要求1所述的一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用,其特征在于:步骤(10)中,3倍柱体积为20ml;PBS溶液的pH为7.2~7.4。

一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明是一种提取试剂盒,特别涉及一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用。

背景技术

[0002] 目前,血液样品中提取外泌体的最常见的方法有超速离心法、PEG沉淀试剂法、SEC柱法、超滤法和免疫磁珠法等。超速离心法和免疫磁珠法受到仪器和耗材的限制,且成本高。其他几种方法的提取试剂盒在血液样品中提取的效果并不佳,是由于血液样本自身的特殊性。血液样本除去细胞和血小板后,仍然存在很多的杂质血液蛋白质,如白蛋白和载脂蛋白,蛋白聚合体等。这些血液中的杂质蛋白有些和外泌体的分子尺寸非常相近,对提取纯化外泌体造成了很大的困难,通过简单的sec柱法或者超滤法都很难得到高质量的外泌体。外泌体常见的三种检测手段western blot、NTA和电镜检测。特别是血液样品中的电镜检测效果容易受杂质影响,很难找到清晰的外泌体形态图。

[0003] 外泌体是由多泡体与细胞膜融合后,释放到细胞外的,直径介于30-150nm的膜性小囊泡,具有磷脂双分子层结构的囊泡,广泛存在于各种体液中,其内含有蛋白质、脂质、核酸等多种活性生物分子。外泌体是细胞间通讯的载体。专利“血清或血浆中的外泌体制备试剂盒及外泌体制备方法”中应用到PEG沉淀、蛋白酶K预处理以及纯化微球的使用。PEG沉淀法的原理为:通过聚合物劫持水分子,使得外泌体溶解度降低,进而在低速离心条件下发生沉降。蛋白酶K预处理:用蛋白酶K(一种具有广泛特异性的丝氨酸蛋白酶)预处理血清或血浆样品,对于在纯化过程中减少白蛋白和与外泌体相关的载脂蛋白A-1和B的数量至关重要。琼脂糖珠与有机基团进行了偶联,偶联了有机基团的琼脂糖珠可以吸附沉降下来的杂质蛋白颗粒,使得提取得到的外泌体纯度更高。此方法缺点是PEG会和外泌体共同沉降下来,产生难以去除的聚合物,琼脂糖珠偶联有机基团,操作复杂成本高。专利“一种提取血浆外泌体的试剂盒及其应用”中采用了亲和素修饰的纳米磁珠溶液、生物素修饰的特异性适配体溶液和磁分离装置。缺点试剂成本高。专利“人血浆外泌体的快速、高纯分离方法”首先利用琼脂糖凝胶小柱对人血浆进行预分离,除去大部分尺寸较小的高丰度蛋白;并将收集得到的馏分依次进行合并,超滤浓缩;然后利用高效液相体积排阻色谱分离,实现外泌体和干扰脂蛋白的分离,最终得到高纯的人血浆外泌体馏分。需要用到高效液相色谱,设备成本高。专利“一种高效快速分离血浆外泌体的方法”包括以下步骤:步骤一:配制得亲水聚合物溶液;步骤二:稀释得稀释后的血浆;步骤三:离心去除血浆中的细胞成分得去除细胞的血浆;步骤四:进行超高速离心沉淀得沉淀外泌体;步骤五:使用磷酸缓冲盐溶液悬浮得悬浮的外泌体;步骤六:使用酚和硫氰酸胍的单相溶液得重新溶解的悬浮外泌体;步骤七:加入200 μ l氯仿并振荡15秒后得振荡后的外泌体溶液;步骤八:离心15分钟得分层的外泌体溶液;步骤九:吸取最上层的无色液体得上清层液体;步骤十:加入同等体积的异丙醇进行沉淀得高纯度的外泌体沉淀物。此方法用到有机试剂毒性大,可能污染破坏外泌体。

[0004] 上述所提及的专利：

[0005] 专利“血清或血浆中的外泌体制备试剂盒及外泌体制备方法”CN 108918228 A

[0006] 专利“一种提取血浆外泌体的试剂盒及其应用”CN 109266606 A

[0007] 专利“人血浆外泌体的快速、高纯分离方法”CN 113252808 A

[0008] 专利“一种高效快速分离血浆外泌体的方法”CN 111996165 A

发明内容

[0009] 一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用。该方法通过三步差速离心，除去细胞、血小板和非外泌体微泡。又通过针孔式过滤器去除220nm以上杂质，再通过蛋白酶处理溶解杂质蛋白（白蛋白和载脂蛋白等）或使蛋白聚合体分解成小的肽段，然后通过超滤法去除10nm以下的杂质。留下的样本分子尺寸处于外泌体的分子尺寸范围，最后通过SEC柱在外泌体区域得到纯化外泌体，最后根据浓度要求，再进一步超滤，纯化并浓缩得到高质量外泌体。该组合方法简单易行，效果显著，成功解决了血液样品成分复杂，杂蛋白多，外泌体分离提取难度大，电镜下难于找到清晰的外泌体囊泡状结构等问题。

[0010] 本发明的上述技术问题主要是通过下述技术方案得以解决的：

[0011] 一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用，按以下步骤进行：

[0012] (1)、收集管收集到人血液：温度为4℃，重量为200～500g，离心时间为5-10min，离心结束后转移上清到新的离心管；

[0013] (2)、转移后的上清：温度为4℃，重量为2000～2500g，离心时间为10～15min，离心结束后陆续转移上清到新的离心管；

[0014] 步骤(1)与(2)分二个步骤，其原因在于：第一次低速离心是为了把血液中完整的细胞等离心下来，第二次离心提高转速是为了离心一些已经破碎的细胞内容物或者杂质等。如果第一次就转速高，很可能细胞会破裂，内容物释放，无法完全沉淀下来，造成后期外泌体纯化污染。

[0015] (3)、等步骤(2)结束后，转移上清到新的离心管，作为人血浆样品；

[0016] (4)、用PBS将步骤(3)制得的血浆进行稀释，稀释血浆至2倍体积，再进行离心操作：温度为4℃，重量为10000-18000g，离心时间为30min，离心结束后转移上清到新的离心管；

[0017] (5)、步骤(4)后，将新的离心管的血液依次通过0.8um滤膜和0.22um滤膜进行过滤处理；

[0018] (6)、对步骤(5)中过滤后的血液进行蛋白酶消化处理，蛋白酶为胃蛋白酶、胰蛋白酶或其它具有蛋白消化功能的酶中的一种或多种；

[0019] 配制蛋白酶溶液50-1000ug/ml，血液样本加入蛋白酶溶液50-1000ul/ml，旋涡30秒混匀；蛋白酶用PBS或双蒸水稀释。

[0020] (7)、步骤(6)后，将混匀后的溶液加入到温度为37℃的水浴锅中孵育5～60分钟；

[0021] (8)、步骤(7)后，转移到60℃水浴锅中孵育3～15分钟；

[0022] (9)、步骤(8)后，转移样品到预处理过的100KD超滤管中，温度为4℃，重量为3000-

4500g,离心时间为5-15min;弃滤过液,超滤管内液体转移到新的离心管中,用移液枪取适量PBS轻轻吹洗超滤管的滤膜数次,并转移溶液到方才的离心管中,离心管中样品量终体积为0.5-3ml;

[0023] (10)柱平衡:3倍柱体积的PBS溶液润洗SEC柱;润洗完成,待底盖出口无液体流出后,加入步骤(9)离心管中样品,待底盖出口样品流尽,无液体流出,再加洗脱液PBS溶液,空柱体积为前1.5ml不收集,收集所需外泌体的体积为空柱体积之后的1~4ml洗脱液;

[0024] (11)、转移收集的洗脱液到100KD超滤管,温度为4℃,重量为3000-4500g,离心时间为5-15min;弃滤过液,根据外泌体浓度需求,加0.2~1ml的PBS溶液于100KDa超滤管的滤膜上,静置1~3min;用移液枪吸取滤膜上的PBS溶液,轻轻吹洗超滤膜数次,收取所需浓度的外泌体,于-80摄氏度保存。

[0025] 作为优选,步骤(10)中,3倍柱体积为20ml;PBS溶液的pH为7.2~7.4。

[0026] 本发明公开了一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用。通过三步差速离心,除去细胞、血小板和非外泌体微泡。又通过针孔式过滤器去除220nm以上杂质,再通过蛋白酶处理溶解杂质蛋白(白蛋白和载脂蛋白等)或使蛋白聚合体分解成小的肽段,然后通过超滤法去除10nm以下的杂质。留下的样本分子尺寸处于外泌体的分子尺寸范围,最后通过SEC柱在外泌体区域得到纯化外泌体,最后根据浓度要求,再进一步超滤,纯化并浓缩得到高质量外泌体。该组合方法简单易行,效果显著。特别是后续操作前的蛋白酶使用,不仅溶解了部分杂蛋白,还使得蛋白聚合体分解成小的肽段,杂蛋白再通过超滤和SEC柱逐一去除。由于血液样品成分复杂,杂蛋白多,有些蛋白以及蛋白聚合体和外泌体尺寸大小类似,简单通过SEC柱或超滤根本无法成功的与外泌体分离。此组合方法,解决了血液样品成分复杂,杂蛋白多,外泌体分离提取难度大,电镜下难于找到清晰的外泌体囊泡状结构等问题。

附图说明

[0027] 图1为本发明中western blot方法验证血浆外泌体提取结果;

[0028] 图1中HSP70,TSG101,CD9和CD63为人类的外泌体标志性蛋白;

[0029] 图2为本发明中血浆外泌体提取NTA结果;

[0030] 图2中稀释1000倍上机,ZetaView纳米颗粒跟踪分析仪进行NTA检测;上机检测浓度为 7.7×10^7 particles/ml,原外泌体浓度 7.7×10^{10} particles/ml。

[0031] 图3为本发明中血浆外泌体提取电镜结果;

[0032] 图4为本发明中western blot方法验证胃蛋白酶处理血浆样品;

[0033] 图4中Albumin和Apolipoprotein A1去除效果。1:蛋白酶处理前2:蛋白酶处理后。

[0034] 图5为本发明中SEC柱去除杂蛋白外泌体收集图。

具体实施方式

[0035] 下面通过实施例,并结合附图,对本发明的技术方案作进一步具体的说明。

[0036] 实施例1:一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用,按以下步骤进行:

[0037] (1)、收集管收集到人血液:温度为4℃,重量为200g,离心时间为5min,离心结束后

转移上清到新的离心管；

[0038] (2)、转移后的上清：温度为4℃，重量为2000g，离心时间为10min，离心结束后陆续转移上清到新的离心管；

[0039] (3)、等步骤(2)结束后，转移上清到新的离心管，作为人血浆样品；

[0040] (4)、用PBS将步骤(3)制得的血浆进行稀释，稀释血浆至2倍体积，再进行离心操作：温度为4℃，重量为10000-18000g，离心时间为30min，离心结束后转移上清到新的离心管；

[0041] (5)、步骤(4)后，将新的离心管的血液依次通过0.8um滤膜和0.22um滤膜进行过滤处理；

[0042] (6)、对步骤(5)中过滤后的血液进行蛋白酶消化处理，蛋白酶为胃蛋白酶、胰蛋白酶或其它具有蛋白消化功能的酶中的一种或多种；

[0043] 配制蛋白酶溶液50-1000ug/ml，血液样本加入蛋白酶溶液50-1000ul/ml，旋涡30秒混匀；蛋白酶用PBS或双蒸水稀释。

[0044] (7)、步骤(6)后，将混匀后的溶液加入到温度为37℃的水浴锅中孵育5分钟；

[0045] (8)、步骤(7)后，转移到60℃水浴锅中孵育3分钟；

[0046] (9)、步骤(8)后，转移样品到预处理过的100KD超滤管中，温度为4℃，重量为3000-4500g，离心时间为5min；弃滤过液，超滤管内液体转移到新的离心管中，用移液枪取适量PBS轻轻吹洗超滤管的滤膜数次，并转移溶液到方才的离心管中，离心管中样品量终体积为0.5ml；

[0047] (10)柱平衡：3倍柱体积的PBS溶液润洗SEC柱；润洗完成，待底盖出口无液体流出后，加入步骤(9)离心管中样品，待底盖出口样品流尽，无液体流出，再加洗脱液PBS溶液，空柱体积为前1.5ml不收集，收集所需外泌体的体积为空柱体积之后的1ml洗脱液；

[0048] (11)、转移收集的洗脱液到100KD超滤管，温度为4℃，重量为3000-4500g，离心时间为5-15min；弃滤过液，根据外泌体浓度需求，加0.2ml的PBS溶液于100KDa超滤管的滤膜上，静置1min；用移液枪吸取滤膜上的PBS溶液，轻轻吹洗超滤膜数次，收取所需浓度的外泌体，于-80摄氏度保存。

[0049] 步骤(10)中，3倍柱体积为20ml；PBS溶液的pH为7.2。

[0050] 实施例2：一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用，按以下步骤进行：

[0051] (1)、收集管收集到人血液：温度为4℃，重量为300g，离心时间为7min，离心结束后转移上清到新的离心管；

[0052] (2)、转移后的上清：温度为4℃，重量为2200g，离心时间为12min，离心结束后陆续转移上清到新的离心管；

[0053] (3)、等步骤(2)结束后，转移上清到新的离心管，作为人血浆样品；

[0054] (4)、用PBS将步骤(3)制得的血浆进行稀释，稀释血浆至2倍体积，再进行离心操作：温度为4℃，重量为15000g，离心时间为30min，离心结束后转移上清到新的离心管；

[0055] (5)、步骤(4)后，将新的离心管的血液依次通过0.8um滤膜和0.22um滤膜进行过滤处理；

[0056] (6)、对步骤(5)中过滤后的血液进行蛋白酶消化处理，蛋白酶为胃蛋白酶、胰蛋白

酶或其它具有蛋白消化功能的酶中的一种或多种;

[0057] 配制蛋白酶溶液800ug/ml,血液样本加入蛋白酶溶液800ul/ml,旋涡30秒混匀:蛋白酶用PBS或双蒸水稀释。

[0058] (7)、步骤(6)后,将混匀后的溶液加入到温度为37℃的水浴锅中孵育25分钟;

[0059] (8)、步骤(7)后,转移到60℃水浴锅中孵育8分钟;

[0060] (9)、步骤(8)后,转移样品到预处理过的100KD超滤管中,温度为4℃,重量为3500g,离心时间为10min;弃滤过液,超滤管内液体转移到新的离心管中,用移液枪取适量PBS轻轻吹洗超滤管的滤膜数次,并转移溶液到方才的离心管中,离心管中样品量终体积为2ml;

[0061] (10)柱平衡:3倍柱体积的PBS溶液润洗SEC柱;润洗完成,待底盖出口无液体流出后,加入步骤(9)离心管中样品,待底盖出口样品流尽,无液体流出,再加洗脱液PBS溶液,空柱体积为前1.5ml不收集,收集所需外泌体的体积为空柱体积之后的2ml洗脱液;

[0062] (11)、转移收集的洗脱液到100KD超滤管,温度为4℃,重量为3500g,离心时间为10min;弃滤过液,根据外泌体浓度需求,加0.8ml的PBS溶液于100KDa超滤管的滤膜上,静置2min;用移液枪吸取滤膜上的PBS溶液,轻轻吹洗超滤膜数次,收取所需浓度的外泌体,于-80摄氏度保存。

[0063] 步骤(10)中,3倍柱体积为20ml;PBS溶液的pH为7.3。

[0064] 实施例3:一种基于蛋白酶处理、SEC柱和膜滤技术相结合的血液样本外泌体提取试剂盒及应用,按以下步骤进行:

[0065] (1)、收集管收集到人血液:温度为4℃,重量为500g,离心时间为10min,离心结束后转移上清到新的离心管;

[0066] (2)、转移后的上清:温度为4℃,重量为2500g,离心时间为15min,离心结束后陆续转移上清到新的离心管;

[0067] (3)、等步骤(2)结束后,转移上清到新的离心管,作为人血浆样品;

[0068] (4)、用PBS将步骤(3)制得的血浆进行稀释,稀释血浆至2倍体积,再进行离心操作:温度为4℃,重量为18000g,离心时间为30min,离心结束后转移上清到新的离心管;

[0069] (5)、步骤(4)后,将新的离心管的血液依次通过0.8um滤膜和0.22um滤膜进行过滤处理;

[0070] (6)、对步骤(5)中过滤后的血液进行蛋白酶消化处理,蛋白酶为胃蛋白酶、胰蛋白酶或其它具有蛋白消化功能的酶中的一种或多种;

[0071] 配制蛋白酶溶液1000ug/ml,血液样本加入蛋白酶溶液1000ul/ml,旋涡30秒混匀:蛋白酶用PBS或双蒸水稀释。

[0072] (7)、步骤(6)后,将混匀后的溶液加入到温度为37℃的水浴锅中孵育60分钟;

[0073] (8)、步骤(7)后,转移到60℃水浴锅中孵育15分钟;

[0074] (9)、步骤(8)后,转移样品到预处理过的100KD超滤管中,温度为4℃,重量为4500g,离心时间为15min;弃滤过液,超滤管内液体转移到新的离心管中,用移液枪取适量PBS轻轻吹洗超滤管的滤膜数次,并转移溶液到方才的离心管中,离心管中样品量终体积为3ml;

[0075] (10)柱平衡:3倍柱体积的PBS溶液润洗SEC柱;润洗完成,待底盖出口无液体流出

后,加入步骤(9)离心管中样品,待底盖出口样品流尽,无液体流出,再加洗脱液PBS溶液,空柱体积为前1.5ml不收集,收集所需外泌体的体积为空柱体积之后的4ml洗脱液;

[0076] (11)、转移收集的洗脱液到100KD超滤管,温度为4℃,重量为4500g,离心时间为15min;弃滤过液,根据外泌体浓度需求,加1ml的PBS溶液于100KDa超滤管的滤膜上,静置3min;用移液枪吸取滤膜上的PBS溶液,轻轻吹洗超滤膜数次,收取所需浓度的外泌体,于-80摄氏度保存。

[0077] 步骤(10)中,3倍柱体积为20ml;PBS溶液的pH为7.4。



图1

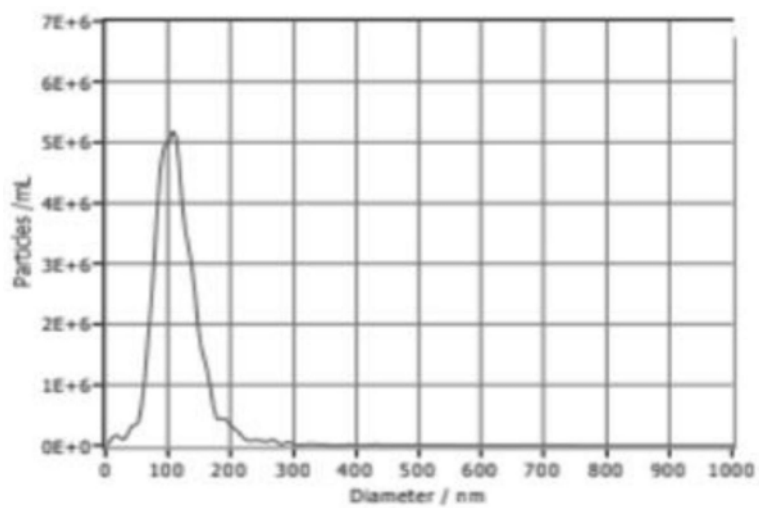


图2

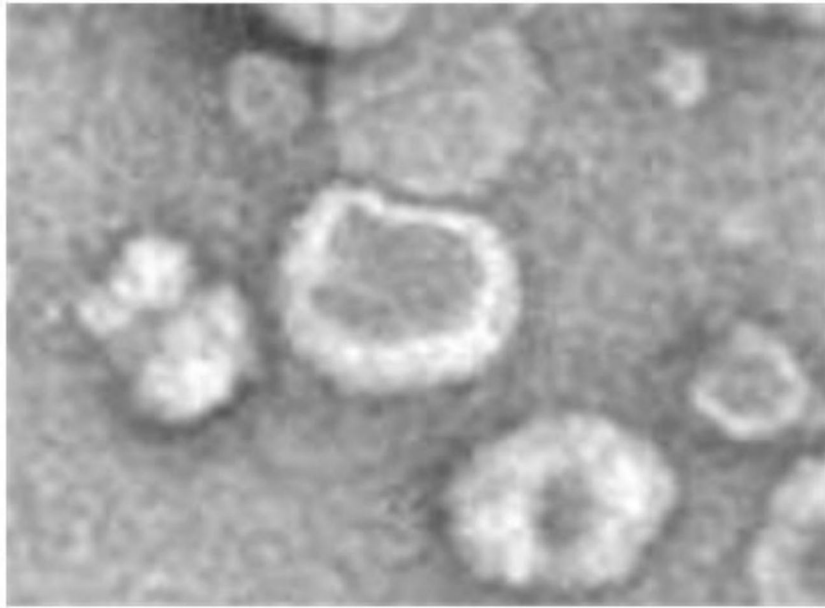


图3

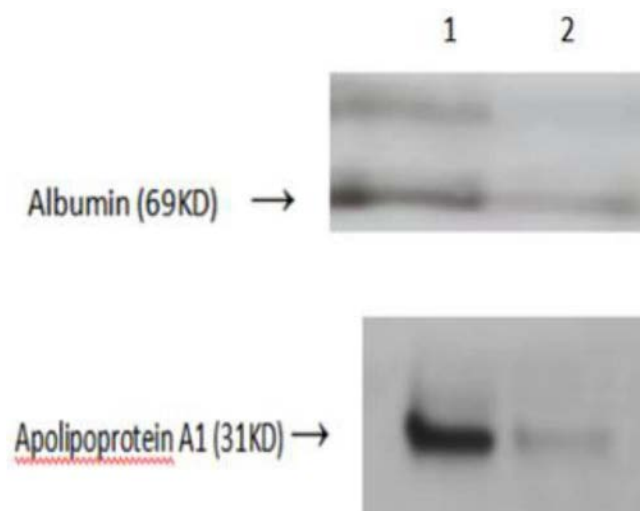


图4

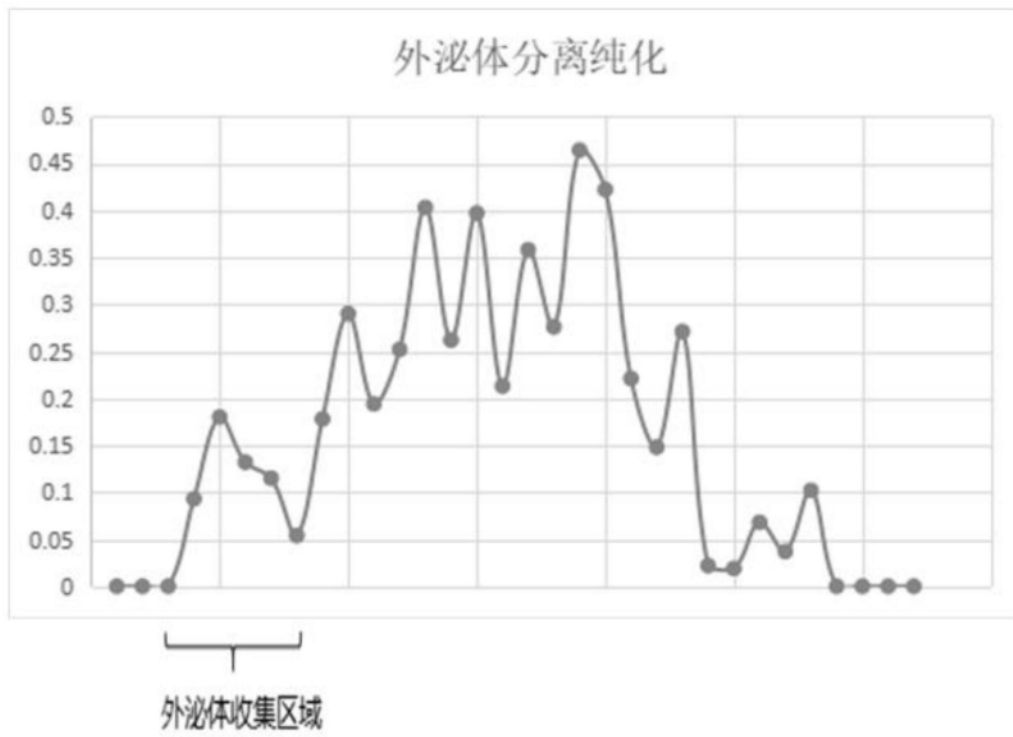


图5